

み出す「幹細胞」の機能制御にとって必須である。殊に、神経幹細胞にこの異常が誘発されると、適切な神経系細胞の供給が行えなくなり、中枢神経系に恒久的な影響が残る可能性がある。しかし、メチル化修飾を攪乱する化学物質は、その毒性学的な重要性にもかかわらず、分子メカニズムの詳細は不明な点が多く、分子毒性基盤の整備は未だなされていない。

そこで、マウス胎児由来の神経幹細胞をモデルとして用い、シトシン塩基脱メチル化剤として知られる 5-アザシチジン(AzaC)を神経幹細胞に暴露することで、神経幹細胞の機能制御における DNA メチル化の役割を、国立衛研・毒性部において分担研究者らが開発した Percellome 手法を適用した網羅的遺伝子発現解析の結果を通して検討し、メチル化修飾を攪乱する化学物質の神経幹細胞への影響の分子メカニズムを解明する。本年度は、胎児神経幹細胞の2種類の基盤データベース(胎児終脳発生に伴う遺伝子発現変化網羅的データベース、発生時期の異なる神経幹細胞遺伝子発現網羅的データベース)整備に加え、経胎盤的に AzaC を暴露した胎児終脳における影響の解析を行った。

(2) 発がんプロモーション過程の甲状腺及び肝の自律性の変調についての解析

医薬品として開発された化学物質の中にしばしば見受けられる発がん物質は、各種遺伝毒性試験で明らかな遺伝子傷害性を示さず、その機序が殆ど不明な非遺伝子傷

害性のものが多い。

発がんの初期過程は、イニシエートされた細胞が組織臓器の構成成分としての恒常性を破綻させて、自律性の増殖形質を獲得することを起点としているが、その細胞環境に多大な影響を受ける。変異原性の知られていない医薬品等の動物に対する長期投与でしばしばみられる発がん性は、このような恒常性の破綻によって生じるものが殆どであると考えられているが、化学物質固有の生体反応性から、がん化に至る反応性を弁別するのは、初期病変と発がんの母地を区別して解析する必要があるため、現在まで殆ど研究が進んでいない。

本研究では、がん病変とその発生母地での網羅的遺伝子発現解析を行い、投与された化学物質による発がん過程特異的に誘起される遺伝子群の同定を行う。また、発がんに寄与しない化学物質特異的な遺伝子発現と弁別するために、イニシエーションの有無での遺伝子発現プロファイルを比較し、がんの発生に必要なプロファイルを同定する。このプロファイルを基に発がんに寄与する主要なメカニズムを同定する。標的臓器は肝臓と甲状腺とし、それぞれについて強力な発がんプロモーション作用を示す phenobarbital (PB)及び kojic acid (KA)を用いる。部位特異的な発現解析手法として、独自に開発したパラフィン包埋切片中の微量組織からの定量的 RNA 発現解析を可能とするメタカーン固定法を用い、マイクロダイセクション法によりがん病変(あるいは前がん病変)と非がん部を分けてマイクロアレイ

解析を行う。

KA は *Aspergillus*、*Acetobactor*、*Penicillium* 等のカビにより生成される代謝物質で、日本では古くからみそや酒の発酵食品の生産に用いられてきた。本物質は静菌作用の他、シイタケチロシナーゼやポリフェノールオキシダーゼの阻害作用を有し、生エビやカニ等の変色防止の他、美白剤として用いられてきた。この物質は、抗甲状腺作用を示すが、その作用は、甲状腺でのヨード取り込みと有機化の抑制に起因した甲状腺ホルモン合成抑制によることが報告されている。また、本剤はラット甲状腺に対し発がん性を示し、ラット甲状腺二段階発がんモデルにおいて、イニシエーターとして N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) を投与した後、本剤の連続投与により、4 週目から甲状腺濾胞上皮細胞の過形成や腺腫が誘発され始め、その進展には血清中の高い甲状腺刺激ホルモン (TSH) レベルが重要な役割を果たすことが報告されている。しかし、その進展過程での分子機序はほとんど解明されていない。

今年度は、まず KA 誘発甲状腺発がん機序を解明するために、マイクロアレイ法による発がんプロモーション過程早期(投与 4 週目)に特異的に発現変動する遺伝子群の同定を行い、次いで、マイクロダイセクション法とマイクロアレイ法の併用による腫瘍性増殖形質の獲得に関与する遺伝子群の同定に着手した。また、別の研究班で遂行中の研究である、ラットに抗甲状腺作用を有することが知られている sulfadimethoxine (SDM) に

よるラット甲状腺発がんプロモーション作用特異的に発現の増減する遺伝子と共通するものを検索し、抗甲状腺作用に起因するその発がん標的遺伝子を選別した (図 13)。

ラット肝臓に対して肝発がん promotion 作用を示す代表的なプロモーターである phenobarbital (PB) については、現在まで、数々の発がんメカニズムに関する研究が行われてきた。近年、その受容体である CAR が同定され、PB による発がん作用は CAR 依存的であることがわかってきたものの、実際の肝臓での発がんメカニズムに関与する遺伝子に関する検討は殆どなされていない。そこで、本研究では、ラット肝中期発がん性試験法を用いて、そのプロモーション作用検出のエンドポイントであるプロモーション 6 週の時点で、PB により最終的には肝細胞をがんに至らしめる、恒常性破綻メカニズムの探索を行った。

B. 研究の方法

(1) 恒常性維持に関わるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした研究

胎児終脳発生に伴う遺伝子発現変化網羅的データベース

マウス(C57BL/6CrSlc)胎生 10.5 日から 16.5 日まで連日胎児終脳を雌雄を分けて採取し、Percellome 手法を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。サンプルは各群 3 サンプルとし、DNA マイクロアレイはアフィメトリクス社 GeneChip Mouse Genome430 2.0 (約 45000 プローブセット)を用いた。

発生時期の異なる神経幹細胞遺伝子発現網羅的データベース

胎児期の神経幹細胞は胎生中期にはその分化能力が未成熟でニューロンにしか分化しないが、胎生後期になるに従って成熟し、アストロサイト、オリゴデンドロサイトにも分化するようになる特徴を持つことが明らかとなっている。そこで、基盤データベースとして発生時期の異なる神経幹細胞の遺伝子発現を網羅的に解析したデータベース作製を行った。具体的には、神経幹細胞を優先的に培養するニューロスフェア法を用い、胎生 11.5 日から 14.5 日まで連日胎児終脳からニューロスフェアを得、Percellome 手法を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。

In utero AzaC 暴露の胎児終脳に対する影響の Percellome 解析

DNA メチル化を化学物質で変化させ、それに伴う遺伝子発現変動を解析するために、AzaCを胎生 10.5 日に経胎盤的に母体投与し、メチル化が高く神経幹細胞がニューロンにしか分化しない胎生 11.5 日及び、脱メチル化が進み、神経幹細胞がニューロン以外への分化能を獲得した胎生 14.5 日に胎児終脳を採取し、Percellome 解析した。AzaC の投与量は、投与に伴う apoptosis 誘導が起らない量を設定し、その量をはさんだ前後の3段階(0.1, 0.3, 1mg/kg/day)を用いた。

RNA の分離精製

Percellome 手法に基づき検体を処理した。

すなわち、組織を分離後すみやかに RNAlater (Ambion 社)により RNase を不活化した。RNAlater 除去後、RLT buffer (Qiagen 社)を用いて組織破砕液を調製した。DNA 定量用蛍光試薬 Picogreen を用いて破砕液中の DNA 量を測定し、DNA 量に応じて Spike RNA cocktail (Bacillus RNA 5 種類の Mix)を添加した。TRIzol を用いて粗抽出し、RNeasy Kit により精製し、Total RNA を得た。精製した total RNA は電気泳動により品質を確認した。

GeneChip 解析(Percellome 手法適用)

アフィメトリクス社のプロトコールに従い、total RNA 5 μ g を T7 プロモーターが付加されたオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し、cDNA を調製した。この cDNA を基に第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA polymerase (Enzo 社)によりピオチン化 CTP、UTP の存在下 cRNA を合成した。二本鎖 DNA 及び cRNA 精製には GeneChip sample cleanup module (アフィメトリクス社)を使用した。得られた cRNA を 300-500bp になるように断片化し、ハイブリダイゼーションコントロールを添加し、GeneChip ターゲット溶液とした。GeneChip は Mouse Genome 430 2.0 Array を使用した。45°C、18 時間のハイブリダイゼーション後、phycoerythrin (PE)ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーで測定した。測定したデータの標準化は Spike RNA の測定値を基に各遺伝子のシグナル値を細胞1個当たりのコピー数に変換する Percellome 手法を用いて行った。解析

は主に当部で開発した MF software を用いて行った。

(2) 発がんプロモーション過程の甲状腺及び肝の自律性の変調についての解析

KA 実験:

動物は、5 週齢の雄性 F344 ラット(日本 SLC)を用い、無処置群、DHPN 単独投与群については一群 20 匹ずつ、その他の群については一群 8 匹ずつ計 6 群に群分けした(図 14)。一週間馴化した後、DHPN 単独投与群と二段階発がんモデル群には DHPN を 2800 mg/kg、無処置群と KA 単独投与群には生理食塩水を相当量、単回皮下注射した。DHPN 投与一週後、KA 単独投与群と二段階発がんモデル群には KA を各々 2.0% (KA 単独投与群)、0.125, 0.5, 2.0% (DHPN+KA 群)の用量で基礎飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母)に混じて投与した。実験期間中、動物の体重は週一回、飼料摂取量の測定は週 1 回実施した。KA 投与 4 週後に全動物をジエチルエーテル吸入麻酔下で放血殺し、RNase 除去した器具で上皮小体や結合組織など甲状腺周囲組織を除去し、両側の甲状腺を採取した。甲状腺の重量を測定後、無処置群、DHPN 単独投与群については 4 個体分の両側甲状腺をまとめ、計 4 サンプルを遺伝子解析用として RNA later (Ambion)に浸漬させ、残り 4 個体の両側甲状腺を形態観察用にホルマリン固定した。その他の群については、各個体の両側の甲状腺を頭側、尾側に二分し、頭側をホルマリン固定、尾側を RNA later に浸漬し個体ごと

に採材した。ホルマリン固定材料は、定法に従い切片を作製し、hematoxylin-eosin 染色して病理組織学的検索を実施した。遺伝子解析用サンプルは、4°C一晩 RNA later に浸漬した後、-80°Cで保存した。Total RNA 抽出は、RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて行い、回収量は RiboGreen RNA Quantitation kit (Molecular Probe)を用いて測定した。さらに、RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies)を用いて、回収した total RNA のクオリティーを確認した。各群から 4 サンプルを用意し、回収した 1 μ g の total RNA について MessageAmpTM II aRNA kit (Ambion)を用いて 1 回増幅した。マイクロアレイは GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix)を用い、GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix)にて発現データを取り込んで定量した。方法としては、GeneSpring ver.5.1 (Silicon Genetics)を用いて、各データの per chip normalization を global normalization により行い、無処置対照群と DHPN 単独群、2.0% KA 群あるいは DHPN+2.0% KA 群と比較して 2 倍以上、あるいは 1/2 倍以下に変動した遺伝子について検索した。それらについてさらに DHPN+2.0% KA 群と DHPN 単独群または 2.0% KA 群間で比較し、DHPN+2.0% KA 群において特異的に 2 倍以上、あるいは 1/2 倍以下に変動した遺伝子数を検索した。さらに、KA の用量に依存して DHPN 単独群に比しに 2 倍以上、あるいは 1/2 倍以下に変動した遺伝子について検索し、それらを同定した。

KA の用量に依存して発現変動した代表

的な遺伝子(5 遺伝子;後述)については、マイクロアレイ法により得られた発現量を検証するため、リアルタイム RT-PCR を実施した。方法としては、まず、前述の方法により得た total RNA を 1 μ g ずつ、無処置群、DHPN 単独群については各 4 サンプル、DHPN+2.0% KA 群については 6 サンプル用意し、High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems; ABI)を用いて逆転写反応を実施した。得られた cDNA 溶液を 25 倍希釈したものを 5 μ l 用いて、ABI 社の PRISM7000 により、TaqMan Probe Detection system に従い、リアルタイム PCR を実施した。PCR 反応液として、前述の cDNA 溶液、TaqMan Universal PCR Master Mix (ABI) と各遺伝子特異的なプライマー、プローブ(いずれも ABI)を用意した。プライマー、プローブは、ハウスキーピング遺伝子の検索のために、hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT)については、以前実施した別の実験 (H. Takagi et al. Toxicol Appl Pharmacol. 208(2):127-136、2005)で用いた特異的プライマーと TaqMan プローブ (ABI)を、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)については TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents (ABI)を用いた。その他 5 遺伝子(ABCA1、Ddah1、Fbp2、Ptprn、Rrad;結果参照)の検索については、Gene Expression Assay (ABI)を用いて、マニュアルに従ってリアルタイム PCR を実施した。PCR 条件は、いずれの遺伝子とも、50° C, 2 min; 95° C, 10 min の後、95° C, 15 sec→60° C, 1 min を

50 サイクルとした。各遺伝子の発現量を、ABI 社の User Bulletin #2 の Standard Curve Method に従って解析し、各遺伝子と 2 種のハウスキーピング遺伝子との相対値を求め、それぞれについて無処置群、DHPN 単独群と DHPN+2.0% KA 群間で比較した。

PB 実験:

動物は、5 週齢の雄性 F344 ラット(日本チャールズ・リバー)を用い、一群 12 匹ずつ計 6 群に群分けした(図 15)。一週間馴化した後、DEN を投与する全群には DEN を 200 mg/kg、無処置群と PB 単独投与群には生理食塩水を相当量単回腹腔内注射した。DEN 投与 2 週後、PB 単独投与群と二段階発がんモデル群には PB を各々 500 ppm (PB 単独投与群)、400, 1200, 500 ppm (DEN+PB 群)の用量で混餌投与した。DEN あるいは PB 単独投与群、DEN+PB 投与各群は、実験開始 3 週目に 2/3 部分肝切除を実施し、無処置群には sham operation を実施した。無処置群と DEN 単独投与群には基礎飼料 CRF-1(オリエンタル酵母)を自由摂取させた。PB 投与 6 週後に全動物をジエチルエーテル吸入麻酔下で放血殺し、RNase 除去した器具で肝臓を採取した。肝臓の重量を測定後、無処置群については内側葉の肝組織を、肝部分切除を施した他の群では切除残余肝組織の一部を遺伝子解析用として RNA later (Ambion)に浸漬させた。DEN を投与した二段階発がんモデル各群で、肝発がんの発指標である glutathione-S-transferase、placental form

(GST-P)陽性細胞巢の免疫組織染色用に肝臓の2スライスを、定法に従いホルマリン固定・パラフィン包埋した。GST-Pの免疫染色はMBL社のウサギ抗血清を用いて、ストレプトABC法で行い、DAB発色し、陽性肝細胞の数及び面積の定量解析をIPAP(住化テクノサービス)にて行った。遺伝子解析用サンプルは、4°C一晩RNA laterに浸漬した後、-80°Cで保存した。Total RNA抽出は、RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて行い、回収量はRiboGreen RNA Quantitation kit (Molecular Probe)を用いて測定した。さらに、RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies)を用いて、回収したtotal RNAのクオリティーを確認した。各群から4サンプルを用意し、回収した5 μ gのtotal RNAについてBioArray™ HighYield™ Transcript Labeling kit (Enzo)を用いて1回増幅とラベリングを行った。マイクロアレイはGeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix)を用い、GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix)にて発現データを取り込んで定量した。遺伝子発現データについて、PBによる発がんに寄与しない遺伝子発現を除外するために、DENによるイニシエーション特異的な遺伝子発現プロファイル及びPB投与のみに起因するプロファイルと比較し、発がん過程に特異的な遺伝子群を同定した。方法としては、GeneSpring ver.7.2 (Silicon Genetics)を用いて、各データのper chip normalizationをglobal normalizationにより行い、明らかなPBの発がん用量を投与したDEN+500 ppm PB群特異的に変化する遺伝子群を、イニシ

エーション単独あるいは500 ppm PB単独投与特異的に変化する遺伝子群と区別し、DEN群に比し有意に2倍以上または0.5倍以下の発現がみられる遺伝子群を選別した。具体的には、DEN+500 ppm PB群で変化する遺伝子群のうち、DENあるいはPB群でも同様の発現変化を示す遺伝子群を除外した。次いで、DEN+500 ppm PB群で有意に発現変化した遺伝子群を検索するために、発現の信頼性を示すflagがDEN群、DEN+500 ppm PB群、500 ppm PB群の12サンプル全てにおいてabsentであった遺伝子を除外し、さらに、DEN+500 ppm PB群でDEN単独投与に比べ2倍以上、あるいは0.5倍以下の発現がみられる遺伝子については、DEN+500 ppm PB群の4サンプル中3サンプルのflagがpresentであったものを選択した。次いで、flagで選抜されたDEN+500 ppm PB群の遺伝子についてOne-way ANOVAによる多群比較を行い、DEN群との間に有意差が認められた遺伝子群を選抜した。さらにDEN+56 ppm PB群、DEN+167 ppm PB群について、DEN+500 ppm PB群と同様の方法で遺伝子を選択し、DEN+500 ppm PB群と共通に変化する遺伝子群、または無関係に変動する遺伝子群を選択した。発現がDEN+500 ppm PB群と共通に変化するもののうち、DEN+56 ppm PB以上の群またはDEN+167 ppm PB以上の群で有意に変化する遺伝子群を同定した。

マイクロアレイ法により得られた発現量を検証するため、代表的な発現増減遺伝子についてABI社のPRISM7900を用いて、total

reaction volume を 50 μ l としてリアルタイム RT-PCR を実施した。発現増加したのものとして、Serine protease inhibitor、kadal type 1 (Spink1)、Pregnancy-induced growth inhibitor (Ok138) の 2 遺伝子、発現減少したのものとして Solute carrier family 34、member 2 (Slc34a2)、Dual specificity phosphatase (Dusp1)、Insulin-like growth factor binding protein 1 (Igfbp1)、の 3 遺伝子を選択し、TaqMan Probe detection system を利用して解析を行い、PCR 条件は KA による甲状腺発がんの実験のものと同じとした。発現値のノーマライゼーションはハウスキーピング遺伝子である HPRT ないし GAPDH の発現値で行った(方法前述)。

統計学的解析は、遺伝子発現レベルを含む numerical data については各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不当分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合、その多重比較は Dunnett の方法で各群の間で有意差検定を行った。病変の発生頻度は、Fisher の直接確率法により検定を行い、病変の強度については、同様の比較を Mann-Whitney's U-test により行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌による経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理に当たっては、研究所の利用規程に従っ

た。

C. 研究結果

(1) 恒常性維持に関わるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした研究

胎児終脳発生に伴う遺伝子発現変化網羅的データベースの構築

マウス(C57BL/6CrSlc)胎生 10.5 日から 16.5 日まで連日胎児終脳を雌雄を分けて採取し(図 1)、Percollome 手法を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。サンプルは各群 3 サンプルとし、DNA マイクロアレイはアフィメトリクス社 GeneChip Mouse Genome430 2.0(約 45000 プローブセット)を用いた。その結果、この時期の終脳の遺伝子発現に性差はほとんどないこと、発達に伴う遺伝子発現の変化はかなり大きいことが明らかとなった(図 2、3、4)。脳神経系細胞マーカーである Nestin(神経幹細胞)、MAP2(ニューロン)、GFAP(アストロサイト)の発現は、Nestin が経時的に低下し、MAP2 は上昇し、GFAP はこの時期はほとんど発現していない(図 6)というものであり、従来からの報告と矛盾しなかった。このデータベースは今後基盤データベースとして活用していく予定である。

発生時期の異なる神経幹細胞遺伝子発現網羅的データベースの構築

胎児期の神経幹細胞は胎生中期にはその分化能力が未成熟でニューロンにしか分化しないが、胎生後期になるに従って成熟し、アストロサイト、オリゴデンドロサイトにも

分化するようになる特徴を持つことが明らかとなっている。そこで、基盤データベースとして発生時期の異なる神経幹細胞の遺伝子発現を網羅的に解析したデータベース作製を行った。具体的には、神経幹細胞を優先的に培養するニューロスフェア法を用い、胎生 11.5 日から 14.5 日まで連日胎児終脳からニューロスフェアを得、Percollome 手法を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。

その結果、発生時期の異なるニューロスフェアは終脳ほどではないが発現の異なる遺伝子を含むことが明らかとなった(図 5、6)。これは発生に伴い神経幹細胞が成熟し、より高い分化能力を獲得することと矛盾しない結果である。

In utero AzaC 暴露の胎児終脳に対する影響の Percollome 解析

DNA メチル化を化学物質で変化させ、それに伴う遺伝子発現変動を解析した。AzaCを胎生 10.5 日に経胎盤的に母体投与し、メチル化が高く神経幹細胞がニューロンにしか分化しない胎生 11.5 日及び、脱メチル化が進み、神経幹細胞がニューロン以外への分化能を獲得した胎生 14.5 日に胎児終脳を採取し、Percollome 解析した。AzaC の投与量は、投与に伴う apoptosis 誘導が起こらない量を設定し(図 7)、その量をはさんだ前後の3段階(0.1, 0.3, 1mg/kg/day)を用いた。AzaC *in utero* 投与により神経幹細胞の分化能力に影響が生じることを投与後に培養した神経幹細胞のアストロサイトへの分化を調べることで検討した(図 8)。その結

果、DNA メチル化率が高く、本来アストロサイトへの分化能を持たない胎生 12.5 日の神経幹細胞が、胎生 10.5 日の AzaC 投与により分化能を得たことが、GFAP 陽性細胞の割合上昇を指標として示された。これは胎生 10.5 日の AzaC 投与により GFAP promoter の DNA メチル化率が低下したこと、すなわち今回用いた投与条件において、胎児終脳で実際に DNA メチル化変化が生じたことを示唆する結果である。網羅的遺伝子発現解析の結果、胎生 14.5 日では発現変化はほとんど見られなかった一方(図 10)、胎生 11.5 日(図 9)で、ISGF3g、Stat1 を含むインターフェロン応答遺伝子群が発現上昇していることが明らかとなった(図 11、12)。また DNA メチル化時のメチル基供与体である S-adenosyl methionine に対する作用が予測される Rsad2 遺伝子の発現が上昇していた(図 12-2)。

(2) 発がんプロモーション過程の甲状腺及び肝の自律性の変調についての解析

KA 実験:

実験期間中の体重の変動を図 16 に示した。体重は、実験開始後 1 週目において無処置対照と比べて DHPN を投与した各群で有意な低値を示した。第 4 週目においては、2.0% KA 群で無処置対照ないし DHPN 群と比較して、第 5 週目においては、DHPN+2.0% KA 群で対照群と比較して有意な低値を示した。解剖時の甲状腺重量は、2.0% KA 群と DHPN+0.5% KA 以上の群において、無処置対照群あるいは DHPN 単独群

に比べて、絶対、相対重量ともに有意な増加が認められた (Table 1)。

甲状腺の病理組織学的検索の結果を Table 2 に示した。無処置群、DHPN 単独投与群とも明らかな病変を認めなかったが、2.0% KA 群においては、全例に軽度から高度のびまん性濾胞上皮肥大を認めた。DHPN+KA 群のうち、0.125%投与群では、明らかな濾胞上皮の病変は認められなかったが、0.5%以上で全例にびまん性肥大を認め、その強度は用量依存的に増加した。さらに、前がん病変と考えられる濾胞上皮の限局性過形成が 0.5%以上で多発し、切面 (左右各 1 切面)あたりの発生個数は用量とともに増加した。

マイクロアレイによる遺伝子発現解析については、DHPN+2.0% KA 群において DHPN 単独群、2.0% KA 群に比し有意に発現変動した遺伝子数を求めた結果、それぞれ 342 遺伝子 (2 倍以上) または 244 遺伝子 (1/2 倍以下) であった (図 17)。そのうち、KA の用量に依存して発現変動した遺伝子数について図 18 に示した。0.125%以上の KA 投与により KA 用量に関連して DHPN 単独群に比し有意に発現変動したものは 8 遺伝子 (1/2 倍以下)、0.5%以上の KA 投与により同様に発現変動したものは各々 12 遺伝子 (2 倍以上)、7 遺伝子 (1/2 倍以下) であった。以上の KA の用量に関連して発現変動した遺伝子の内訳を Table 3、4 に示した。遺伝子名を同定できたものは、2 倍以上の発現増加を示したものは 9 個 (Ras-related associated with diabetes (Rrad), tetraspan 2,

fructose-1,6-bisphosphatase 2, potassium inwardly-rectifying channel, protein tyrosine phosphatase, receptor type, N (Ptpn), dimethylarginine dimethylaminohydase 1 (Ddah 1), sulfotransferase1B1, solute carrier (SLC4a1), TBC1D12) であった。また、1/2 倍以上の発現減少したもののうち、遺伝子名を同定できたものは、0.125% 以上の KA で 5 個 (ischemia related factor (vof-16), complement receptor 2 (CR2/CD21), eukaryotic translation initiation factor 4G1 (eIF4G1), lymphocyte cytosolic protein 2 (Lcp2), kinesin-associated protein 3 (KAP3)), 0.5% 以上の KA で 4 個 (late gestation lung protein 1 (LGL1), fibulin-1, TGF β -inducible early growth response 3, ABCA-1) であった。

KA の用量に関連して発現変動し、遺伝子名を同定できたもののうち、ABCA1、Ddah1、Fbp2、Ptpn、Rrad についてリアルタイム RT-PCR 法で遺伝子発現量を定量した結果、GAPDH、HPRT 遺伝子発現量に対する各遺伝子の相対発現量は、マイクロアレイ法により得られた解析結果とほぼ一致していた (図 19)。

次に、別の研究班の研究として、KA と同じ動物実験計画の中で、SDM の用量反応性を検索する実験を行った。その中で、明らかに甲状腺機能低下と共にその発がんプロモーション作用を示す用量である 1000 ppm SDM 飲水投与群で、プロモーション 4 週目に発現の増減する遺伝子を検索し、2% KA

プロモーション例と同様の変動を示した遺伝子をリストアップした (Table 5、6)。その中で、共通に発現増加した遺伝子のうち、Kinesin family member 3C は SDM に対して用量依存的な反応を示し、Sulfotransferase family 1B, member 1, Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, adenine nucleotide translocator), member 13 は KA に対して用量依存的な反応を示した (Table 5)。発現減少した遺伝子のうち、Cadherin 2 は SDM に対して、Fibulin 1, Ischemia related factor-16 は KA に対して用量依存的な反応を示した (Table 6)。更に、共通に発現の増減した遺伝子のうち、モーター蛋白質あるいはその機能調節に関与する kinesin family member 3C、phosphatase and actin regulator、細胞接着因子である cadherin 2、細胞外マトリックスを構成する microfibrillar-associated protein 2、matrix Gla protein、fibulin 1 等が見出された (図 20)。SDM に対して用量依存的な反応を示した遺伝子として、細胞骨格関連の Kinesin family member 22、pseudo、Kinesin family member C1、細胞接着因子の Protocadherin alpha subunit があり、KA の用量依存性の反応として細胞骨格関連の Kinesin-associated protein 3 と前述した共通遺伝子である細胞外マトリックス fibulin 1 が見出された。

PB 実験:

実験期間中の体重増加は、無処置対照に比べ DEN+PH 群は 1 週目より実験終了時

まで低値を示した (図 21)。PB 併用投与群では 56、167 ppm 併用群で、1-5 週目に、500 ppm 併用群では 1、2、4 週目に低値を示した。摂餌量は DEN を投与した各群で 1 週目に低値を示した。また、PH を施した各群で 4 週目にも低値を示したが、5 週目には反対に高値を示した (図 21)。

実験終了時の最終体重は、無処置対照に比べ DEN+PH 群、DEN+PH+56 ppm PB 群、DEN+PH+500 ppm PB 群で低値を示し、DEN+PH 群との比較では、PH+500 ppm PB 群で有意な増加を示したものの、PB 併用投与各群との間では差は認めなかった (Table 7)。肝臓重量は、無処置対照に比べ、絶対重量の減少が DN+PH 群、DEN+PH+56 ppm PB 群で認められたが、相対重量にこれらの群間で差は認めなかった。また、絶対・相対重量の増加が PH+500 ppm PB 群と DEN+PH+500 ppm PB 群で認められた。DEN+PH 群との比較では、絶対・相対重量の増加が PH+500 ppm PB 群、DEN+PH+167 ppm PB 群、DEN+PH+500 ppm PB 群に認められた。

二段階発がん実験群間での GST-P 陽性細胞巢の形態計測の結果、数、面積とも 560 ppm PB では DEN 単独群と有意な差は認められなかったが、いずれも若干高値を示した (Table 8)。167 ppm 以上で有意な増加を示したが、いずれも用量依存性はなく、167 ppm でむしろ高い傾向があった (Table 8)。

肝臓において発現の増減する遺伝子を検討した結果、Venn diagram から、DEN 単

独、500 ppm PB 単独、DEN+500 ppm PB 群のいずれにおいても変動する遺伝子が多数認められ、その中で DEN+500 ppm PB 群と共通に変動する遺伝子は DEN 群よりも PB 群で優勢であった (図 22)。DEN+500 ppm PB 群のみで発現変動した遺伝子のうち、DEN 単独、500 ppm PB 単独、DEN+500 ppm PB 群の 16 サンプル全てにおいて absent であった遺伝子を除外した結果、増加遺伝子は 148、減少遺伝子は 144 となり、その中で DEN+500 ppm PB 群の 3/4 例が presence を示した遺伝子数がそれぞれ 92、72 となった。更にその中で統計的な有意差を示した遺伝子数はそれぞれ 68、36 であった。PB の用量に依存した発現増加遺伝子は 56 ppm 以上で 6 個、167 ppm 以上で 6 個認められ、その中で機能既知の遺伝子は Syntaxin 6 (Stx6), Wee 1 tyrosine kinase (Wee1), Serine protease inhibitor, kazal type 1 (Spink1), Hemiferrin, Brain Ntab mRNA sequence, Pregnancy-induced growth inhibitor (Ok138) の 6 個であった (Table 9)。また、PB の用量に依存して発現減少したものは 56 ppm 以上で 5 個、167 ppm 以上で 17 個認められ、その中で機能既知の遺伝子は Solute carrier family 34, member 2 (Slc34a2), Dual specificity phosphatase (Dusp1), Insulin-like growth factor binding protein 1 (Igfbp1), Phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K), CD3 antigen, zeta polypeptide (Cd3dz), Adipose differentiation-related protein の 6 個であった (Table 10)。

発現の増減した 5 つの代表的遺伝子 (発現増加: Ok138, Spink1; 発現減少: Dusp1, Igfbp1, Slc34a2) についてリアルタイム RT-PCR により発現レベルの検証を行った結果、一部統計学的有意差はつかなかったものの、いずれの転写産物においても概ねマイクロアレイデータと同等の発現変動を示した (図 23)。

D. 考察

(1) 恒常性維持に関わるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした研究

エピジェネティック制御を介して構築されるシステムである脳神経系の発生に関する Percellome 基盤データベースを2種類整備した。次に、DNA メチル化阻害作用を持つ AzaC をモデル化合物として用い、AzaC により胎児終脳でインターフェロン応答遺伝子群の発現が上昇することを明らかにした。そのメカニズムの一つとして、胎児終脳においては特定の遺伝子群の発現制御領域に脱メチル化を受けやすい共通 DNA 配列が存在する可能性が考えられる。今後この仮説を検証し、化学物質による恒常性維持に関わるエピジェネティック制御機構障害を解析する上で基礎となる情報を得る予定である。

(2) 発がんプロモーション過程の甲状腺及び肝の自律性の変調についての解析

KA 実験:

今年度は、イニシエーション特異的な遺

伝子及び KA 投与による甲状腺機能減少に関連する遺伝子を除外することにより、KA による甲状腺発がん過程の早期に特異的な遺伝子発現プロファイルを検索したが、その結果、KA の用量に関連して発現増加する遺伝子の機能は、イオン輸送、血管新生、糖新生など多岐に及んだ。その内、Ras-related associated with diabetes (Rrad) は、2 型糖尿病患者の骨格筋に過剰発現していることが明らかになり、正常ではヒト心臓、骨格筋、肺に発現している Ras-related GTPase である。腫瘍との関連では、ヒト乳腺腫瘍細胞で、腫瘍転移抑制因子である nm23 とともに移植腫瘍の進展抑制に関する報告があるが、甲状腺腫瘍との関連を示唆する報告はない。Tetraspan は、細胞表面でインテグリンなどの接着分子に関わる膜貫通分子である。ある種の tetraspan (Epithelial membrane protein-2, EMP-2) は腫瘍抑制遺伝子としての機能が示唆されている。Tetraspan 2 は、ミエリン鞘を構成し、グリア細胞の分化に関わることが示唆されているが、甲状腺腫瘍に関連する報告はない。Fructose-1,6- bisphosphatase 2 は糖新生に関わる酵素である。腫瘍組織では高度にエネルギーが消費されるため腫瘍組織内では解糖が、腫瘍周囲組織では糖新生が生じるとされ、ラットに誘発された乳腺腫瘍では fructose-1,6- bisphosphatase 2 など糖新生に関わる酵素の活性が有意に低下したとの報告がある。甲状腺腫瘍に関する報告はない。Potassium inwardly-rectifying channel は 2 型ある K イオンチャンネルのうちの 1 型で、

7 つのサブタイプが存在する。Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6 (Kcnj6) は、ATP 感受性であり、Kcnj6 遺伝子はてんかん発作や膵島 B 細胞からのインスリン放出に中心的役割を果たすことが示唆されている。腫瘍との関連では、ある種の培養ヒト乳腺がん細胞での発現に関する報告はあるが、甲状腺腫瘍との関連での報告はない。別の isoform で、同じく ATP 感受性である kcnj3 が、培養ヒト乳がん細胞やリンパ節転移した乳がん組織で高発現することや、ラット甲状腺濾胞上皮細胞に局在することが報告されている。Protein tyrosine phosphatase (PTP) は、サイトカインレセプターによって活性化されたチロシンリン酸化カスケードを停止させるなど重要な役割をもつ。また PTP は腫瘍抑制遺伝子とされ、さらにある種の receptor type PTP (RPTP) は、ヒト肺がんや膵臓がんを抑制するという報告がある一方、ヒトメラノーマ細胞において腫瘍の進展に伴って PTP 活性が増加するという報告もある。今回の検索で KA の用量に関連して発現増加した protein tyrosine phosphatase, receptor type, N (Ptprn) が腫瘍の進展に関連するという報告はない。Dimethylarginine dimethylaminohydase 1 (Ddah 1) は、窒素酸化物 (NO) 合成の内因性抑制因子である不斉型 dimethylarginine を代謝する。腫瘍との関連については、Ddah 1 はラット C6 グリオーマ細胞において NO 濃度増加や vascular endothelial growth factor (VEGF) 産生を亢進させることにより腫瘍の発達や血

管新生に関与することが示唆されている。Sulfotransferase は多くの発がん性、変異原性物質を硫酸化することによりその生物活性を変化させる。Sulfotransferase1A1 については、その遺伝子多型がヒトの肺がん、膀胱がんリスクに影響することが示唆されているが、Sulfotransferase1B1 については、発がんとの関連での報告はない。Solute carrier (SLC) family は、有機陰イオンの輸送に重要な役割を果たす。SLC4a1 についてはヒト SLC4a1 遺伝子の変異が遺伝性球状赤血球性貧血や腎遠位尿管アシドーシスに関与することが示唆されているが、発がんとの関連での報告はない。TBC1 domain family についての詳細な報告はないが、このファミリーに属する NB4S が、stage 4S のヒト神経芽細胞腫で染色体の転座により truncate しているとの報告がある。

KA による用量に依存した発現減少は、細胞増殖抑制シグナルである TGF β の3個のエフェクター分子や、APC と β カテニンの細胞内輸送に関わる kinesin-associated protein 3 等にみられた。即ち、0.125%以上の KA 投与により発現減少した遺伝子として、まず Ischemia related factor (vof-16)は、両側頸動脈を閉塞させ慢性低血流状態にしたときラット大脳領域に高発現し、認知障害に関連が示唆されている近年発見された遺伝子である。腫瘍や甲状腺との関連を示す報告はない。Complement receptor 2 (CR2/CD21)は、補体成分 C3d、C3dg や Epstein-Barr virus のレセプターであり、外来性病原体や蛋白質に対する先天免疫や

養子免疫に関与し、自己抗原に対する耐性を維持するといった免疫反応に主要な役割を果たす。近年の報告により、ヒト血小板表面に存在する CR2 に Epstein-Barr virus が結合すると TGF- β が放出されることや、HOS-CR2 細胞において CR2 が mitogen-activated protein kinases (MAPK) 活性を単独で亢進させること、培養ヒト悪性 B 細胞においてセリン/スレオニンキナーゼの活性化が CR2 の産生を抑制することが示唆されている。また、ヒト甲状腺腫瘍組織における CR2 を含む complement-regulatory factors の局在検索により、CR2 は濾胞上皮細胞に検出されなかったという報告があるが、ラット甲状腺での発現についての報告はない。Eukaryotic translation initiation factor 4G1 (eIF4G1)は、mRNA の5'末端において翻訳開始に中心的役割を果たす。また、eIF4G1 は、アポトーシスの過程で caspase-3 によって急速に分解され、eIF2 など他のタイプの eIF は、それに遅れて分解され、細胞における蛋白合成が抑制されることが示唆されている。eIF4G1 の甲状腺腫瘍との関連での報告はない。Lymphocyte cytosolic protein 2 (Lcp2) は、近年見出された遺伝子で、造血細胞特異的蛋白質であり、多種の免疫系細胞のシグナル伝達に関与することが示唆されているが、甲状腺あるいは腫瘍との関連は報告がない。Kinesin-associated protein 3 (KAP3)は、細胞内で膜性小器官 membranous organelles をトランスロケート(生体膜輸送)させる微小管関連モーターである KIF3A と KIF3B のヘテロダイマー

(KIF3A/3B)に関連した蛋白で、KIF3A/3Bとヘテロダイマーを形成し、生体内でKIF3A/3Bの細胞膜への結合を促進させることが示唆されている。腫瘍との関連については、ヒトの散发性、家族性大腸癌に対するがん抑制遺伝子である adenomatous polyposis coli (APC)が β -cateninと共にKAP3-KIF3A-KIF3Bにより微小管を通して輸送され、膜突出部先端に蓄積され、細胞の遊走を抑制することが示唆されている。KAP3について甲状腺やその腫瘍の進展に関する報告はないが、ヒト甲状腺腫瘍での β -catenin発現の異常やヒト家族性腺腫様ポリープ症患者の一部にみられる甲状腺腫瘍組織でAPCの変異が認められることが報告されている。また、0.5%以上のKA投与により発現減少した遺伝子として、まず Late gestation lung protein 1 (LGL1)は、cysteine-rich secretory proteins (CRISPs)のファミリー蛋白で、これらの蛋白はN末端が疎水性アミノ酸のクラスター、C末端がcysteine-richな領域から構成されるが、ほ乳類のCRISPsは多くは機能が分かっていない。最近の研究で、CRISP familyは生殖器の発達の細胞接着に機能し、C. elegansの発達過程で、TGF β のシグナリングのエフェクター分子として機能することが分かってきた。その中で、LGL1は胎児の肺でglucocorticoid-inducible geneとして見出されてきた遺伝子であり、胎児の間葉系細胞から分泌され、上皮細胞に取り込まれて、気道上皮のブランチングに機能する。また、ニワトリ胚において腭臓や甲状腺の間葉系細

胞に発現し、その発達に関わることが報告されている。発がんとの関連での報告がない。ABCA-1はATP-binding cassette transportersのひとつで、ABCは特定の蛋白(Lipophilicityは蛋白により異なる)のtransmembrane translocationに関与するが、その内ABC-1はマクロファージからコレステロールやリン脂質の排出に関与し、その過程にTGF β の関与が報告されている。発がんとの関連の報告はない。Fibulin-1は細胞外マトリックス蛋白で、上皮性の卵巣癌や肺癌に過剰発現している。この蛋白は、腫瘍細胞の移動や、そのanchorage-independent growthに関与すると考えられている。また、子宮内膜で性周期の過程で内膜上皮や間質細胞に発現が変化し、プロジェステロンやエストロゲンにより発現が制御されることが知られている。また4つのmajorなspliced variants(A, B, C, D)が存在し、それぞれ機能が異なることが想定されている。すなわち、fibulin-1Cは正常に発現するが、fibulin-1Dは発達の過程でapoptosisを減少させる。TGF β -inducible immediate early gene (Tieg)はC末端に3個のC₂H₂-zinc finger DNA binding motifを有するSp1-like transcription factorsに属する。Tiegは3種類同定されており、TGF β に反応して発現の増加することが分かっている。

以上のことから、DHPNによりイニシエートされた細胞が、甲状腺ホルモン環境の恒常性破綻によるプロモーション作用を受けた状態で、腫瘍性細胞増殖や血管新生の活性化、TGF- β シグナリングの抑制、カドヘリ

ンや APC の制御破綻を示唆する発現変動が見出され、マイクロアレイ解析の結果選別された 5 つの代表的な発現増減遺伝子は、概ねマイクロアレイデータと同等の発現変動を示し、データは検証されたものと考えられた。遺伝子名を同定できたもののうち、いくつかの遺伝子産物について、免疫染色による局在を検索したが、いずれも良好な結果が得られず、細胞局在を示すことは困難であった。現在、KA 投与後 10 あるいは 15 週で発生した腺腫、腺がんとその周囲組織を Laser microdissection システムでパラフィン包埋微量組織から選択的に採取しており、今後はマイクロアレイによる腫瘍性増殖形質の獲得に関与する遺伝子群の同定を進める。

また、甲状腺機能低下に起因して生じる発がんプロモーション過程で発現変動する遺伝子として、細胞骨格のモーター蛋白質あるいはその機能調節蛋白質、細胞接着因子、細胞外マトリックス等、相互に作用しあうことが知られている遺伝子産物が早期からの標的遺伝子候補として見出されてきた。今後、この方面での経時的な解析により、甲状腺機能低下に起因する甲状腺発がん初期のメカニズムの解明が期待される。

PB 実験:

PB 実験をまとめてみると、167 ppm 以上から明らかな肝発がんプロモーション作用が認められ、プロモーション過程特異的な遺伝子発現プロファイリングにより、肝発がんプロモーション作用の明らかに認められない

PB の 56 ppm から用量に伴い発現変動する遺伝子が複数見出された。また、これらのマイクロアレイデータはリアルタイム RT-PCR により検証された。

PB による肝発がんプロモーション過程の早期特異的に発現変動した遺伝子の機能を簡単にまとめてみると、増加遺伝子のうち、Syntaxin 6 は、Trans-Golgi network と endosome との間で蛋白質の vesicular transport に機能することが知られ、Wee 1 tyrosine kinase は核内蛋白質で、Cdc25 とともに phosphatase-kinase switch を構成し、Cdc2 の活性化に関与することが知られている。この分子は S 期と G2 期で合成が増加し、G2/M arrest で発現増加することが知られている。Serine protease inhibitor, kazal type 1 は、膵 trypsin inhibitor の一つで先天性膵炎や膵癌の標的遺伝子と考えられている。Hemiferrin は鉄輸送蛋白質 transferrin の truncated protein であるが、詳しい機能については研究が進んでいない。Pregnancy-induced growth inhibitor は腫瘍等の細胞増殖抑制に機能することが知られている。減少遺伝子のうち、Solute carrier family 34, member 2 は Sodium phosphate の co-transporter で無機リンの恒常性維持に機能することが知られており、腎尿細管や小腸上皮に apical site に発現している。Dual specificity phosphatase は PI3 kinase のシグナリングの下流にある癌抑制遺伝子で PTEN とも呼ばれ、lipid phosphatase と protein tyrosine phosphatase からなる。IGFBP-1 は、IGF-1 の細胞増殖作用に対し

て促進あるいは抑制に機能することが知られているが、その促進・抑制の方向性は細胞や条件によって異なる。PI4-kinase は Trans-Golgi network に存在し、イノシトール 3 ないし 4 リン酸の合成、貯蔵に関与することが知られている。CD3 antigen, zeta polypeptide は T 細胞の腫瘍免疫に機能し、Adipose differentiation-related protein は PPAR γ 2 を介した肝細胞の脂肪蓄積に関与し、いずれも発がんとの関連での報告はない。

以上をまとめると、PB によるラット肝発がん過程の早期に生じる破綻現象としては、細胞増殖抑制や Cell cycle arrest に関連する機能の増強 (Wee-1 kinase, Pregnancy-induced growth inhibitor の発現増加)、一方で、がん抑制遺伝子 (PTEN) の発現低下や鉄輸送機能の亢進 (Hemiferrin の発現増加)、Trans-Golgi network を介したシグナリングの変化 (Syntaxin-6 の発現増加と PI4K の発現低下)、phosphoinositide シグナリングの変化 (Dual specificity phosphatase 1 と PI4K の発現低下) 等が示された。この中で、PB による肝発がんの早期過程では、細胞増殖に関して、抑制方向に進行する細胞機能が推定される遺伝子発現プロファイルが得られた。このことは、ラット肝中期発がん性試験法のエンドポイントとして設定されている 8 週目では、増殖活性の高いイニシエートされた細胞は肝臓の一部を構成するのみで、比較的増殖活性の低い肝細胞が大部分を占めていることに起因するのかもしれない。

E. 結論

(1) 恒常性維持に関わるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした研究

DNA メチル化機構に影響を与えることが示唆されている化合物は、砒素化合物や高用量の DES など、現時点ではその報告は限られている。この一つの理由として何らかの細胞機能を指標とした DNA メチル化修飾機構の有無をスクリーニングする良い系が存在しないことが挙げられる。今年度実施したマウス個体に AzaC を投与した検討で、Rsd2 の発現が投与に伴い発現上昇した。Rsd2 は S-adenosyl methionine に対する作用を有すると考えられている遺伝子である。すなわち、AzaC 投与により DNA へのメチル基供与体である S-adenosyl methionine 量に変化が生じ、Rsd2 の発現上昇が引き起こされた可能性がある。神経幹細胞の発達には、DNA メチル化状態を適切に制御する能動的なシステムの働きが欠かせないと考えられているが、今回の結果は DNA メチル化を変化させそのシステムに障害を与える AzaC の様な化学物質の作用が、システムに関連する遺伝子の発現変化となって現れることを示唆するものである。今後、これらの遺伝子発現変化の意義を基本データベースを活用して解明し、エピジェネティック毒性メカニズムを洗い出すとともに、このことが良いスクリーニング系及び適切な毒性評価系の開発につながることを期待する。

(2) 発がんプロモーション過程の甲状腺・自律性差の解析

発がん性を招来する恒常性破綻の機序を明らかにする目的で、まず、ラット二段階甲状腺発がんモデルを用いて、KA による発がん過程特異的な発現変動遺伝子のプロファイリングを行った結果、腫瘍性細胞増殖や血管新生の活性化、TGF- β シグナリングの抑制、カドヘリンや APC の制御破綻を示唆する発現変動が見出され、発現挙動はリアルタイム RT-PCR により検証された。甲状腺機能低下作用に起因する甲状腺発がんに共通する遺伝子発現変動から、モーター蛋白質あるいはその機能調節に関与する分子、細胞接着因子、細胞外マトリックス構成蛋白質が標的遺伝子と考えられた。PB による発がんプロモーション早期特異的な標的遺伝子として、細胞増殖抑制に関与する Wee-1 kinase や Pregnancy-induced growth inhibitor の発現増加が見出され、PB によるプロモーション 6 週目の肝臓では initiate されている細胞が少なく、主に細胞増殖活性の低い肝細胞から構成されていることを反映していると考えられた。一方で、鉄を介した細胞機能の亢進、Trans-Golgi network で機能するシグナリングの変化、phosphoinositide シグナリングの異常を示唆する発現変動等が見出された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S. Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jan 3;103(1):224-9.

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama and Taku Nagao, "Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. BMC Genomics, 2006, 7:64, in press.

2. 学会発表

菅野 純、五十嵐勝秀、松島裕子、相崎健一、中津則之、トキシコゲノミクスからのアプローチ、第 15 回環境ホルモン学会講演会、2005 年 6 月 2 日、東京

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, "Per cell" mRNA normalization system for microarrays and quantitative PCR. Gordon Research Conference "Toxicogenomics", Jun 5-10, 2005, NH, USA

菅野 純、神経幹細胞モデルに於けるエピジェネティック制御機構障害の

Percellome トキシコゲノミクス研究、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005 年 7 月 1～3 日、東京

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、菅野純、飼料中植物性エストロジェンが内分泌かく乱候補化学物質による遺伝子発現変動に及ぼす影響の Percellome 手法を用いた解析、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005 年 7 月 1～3 日、東京

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、相賀裕美子、菅野 純、Gene expression profiling of a gene targeted mouse embryo using the “Percellome” system as a model for molecular developmental toxicity、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005 年 7 月 1～3 日、東京

小川幸男、関田清司、北嶋聡、斉藤実、松島裕子、山本雅也、児玉幸夫、井上達、菅野純、Toxicity study of Garcinia cambogia extract : Testicular toxicity of Hydroxycitric acid in mice、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005 年 7 月 1～3 日、東京

中津則之、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、小野敦、児玉幸夫、菅野純、Ahr 作動性化学物質の初期遺伝子発現の Percellome 手法を用いた手法、第 32 回日

本トキシコロジー学会学術年会、2005 年 7 月 1～3 日、東京

菅野純、WHO Children’s Program の概説と本邦での現状と取り組みについて、第 17 回神経行動毒性研究会、2005 年 8 月 5 日、東京

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Satoshi Kitajima, Yukio Kodama, Percellome and Mille-Feuille data system for toxicogenomics, 5th World Congress on Alternatives”, August 21-25, 2005, Berlin, Germany

Jun Kanno, Expression Profiling in Mechanistic Toxicology, 9th ICEM Satellite Meeting on Toxicogenomics, August 30 - September 2, 2005, USA

Jun Kanno, Ken-Ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, “Percellome” mRNA normalization system for microarrays and quantitative PCR. 9th ICEM Satellite Meeting on Toxicogenomics, August 30 - September 2, 2005, USA

中津則之、相崎健一、菅野純、Diethylnitrosamine によるマウス肝遺伝子発現変動解析、第 64 回日本癌学会学術

総会、2005年9月14-16日、札幌

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、菅野純、飼料中の植物エストロジェンがトランスクリプトームに及ぼす影響、環境ホルモン学会第8回研究発表会、2005年9月27-29日、東京

菅野純、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、五十嵐勝秀、雌性マウスにおける視床下部-下垂体-性腺系の性周期遺伝子発現のPercellome解析、環境ホルモン学会第8回研究発表会、2005年9月27-29日、東京

◎Jun Kanno, Approaches by Basic Biology to Reinforce the Screening and Testing Strategy for the Endocrine Disruptors, KFDA/NITR International Symposium, Oct 11-12, 2005, Korea

菅野純、ナノマテリアルの安全性確認に関する課題、三菱安全化学研究所講演会、2005年12月1日、東京

Shinya Matsumoto, Kenichi Aisaki, Jun Kanno, Mass Distributed Clustering : A New Clustering Algorithm for Repeated Measurements in Gene Expression Data, The 16th International Conference on Genome Informatics, Dec 19-21, Yokohama

中津則之、相崎健一、五十嵐勝秀、児玉幸夫、菅野純、Diethylnitrosamine 及び N-ethyl-N-nitrosourea によるマウス肝遺伝子発現変動解析、第28回日本分子生物学会、2005年12月7-10日、福岡

高木篤也、中津則之、五十嵐勝秀、菅野純、マウス口蓋形成過程に発現する遺伝子のマイクロアレイ解析、第28回日本分子生物学会、2005年12月7-10日、福岡

北嶋聡、Glenn I. Fishman、富田幸子、井上達、菅野純、相賀裕美子、転写因子 Mesp1 非発現細胞はマウス刺激伝導系細胞に寄与する、第28回日本分子生物学会、2005年12月7-10日、福岡

安彦行人、原口清輝、高橋雄、菅野純、相賀裕美子、Notch シグナルは Tbx6 依存的に Mesp2 発現を活性化する、第28回日本分子生物学会、2005年12月7-10日、福岡

井上薫、渋谷淳、禹桂炯、禹麻美、黒岩敬子、菅野純、五十嵐勝秀、広瀬雅雄:Kojic acid によるラット甲状腺発がん促進過程特異的な発現遺伝子のプロファイリング、第64回日本癌学会学術総会、札幌、第64回日本癌学会学術総会記事 p. 474 (PA3-1116), 9月, 2005

Makoto Shibutani, Kaoru Inoue, Gye-Hyeong Woo, Katsuhide Igarashi,

Jun Kanno, Masao Hirose. Gene
expression profiling specific to the tumor
promotion process of rat thyroid
carcinogenesis induced by
sulfadimethoxine or kojic acid. SOT, San
Diego, USA, March, 2006

渋谷 淳、井上 薫、禹 桂炯、富士本仁、
禹 麻美、五十嵐勝秀、菅野 純、広瀬雅
雄: 甲状腺機能低下に起因する甲状腺発
がんプロモーション過程早期に特異的な
発現遺伝子のプロファイリング。第 141 回
日本獣医学会総会, つくば, 第 141 回日
本獣医学会学術集会講演要旨集, p. 201
(BP-095), 3 月, 2006

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予
定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

4. その他

国内特許申請中(特願
2003-317031、特願 2004-219285)